مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۳/هفته سوم بهمن ماه ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰

شناسایی جهش IVSII-I ژن بتا گلوبین در ناقلین تالاسمی Minor با استفاده از روش High-Resolution Melting (HRM)

فاطمه آخوندی[۱]، دکتر مجتبی عمادی بایگی[۲]، دکتر منصور صالحی[۳]، دکتر پروانه نیک‌پور[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بتا تالاسمی یکی از رایج‌ترین اختلالات اتوزومی مغلوب در جمعیت جهانی است که به وسیله‌ی بیش از ۲۰۰ جهش مختلف در زنجیره‌ی بتا گلوبین، ایجاد می‌شود. این بیماری، از نظر بالینی به سه حالت Minor، بینابینی و Major طبقه‌بندی می‌شود. بتا تالاسمی، رایج‌ترین بیماری تک ژنی در کشورهای مدیترانه، شرق میانه، شبه قاره‌ی هند، جنوب شرقی آسیا و یکی از اختلالات وراثتی گسترده در ایران است. از میان جهش‌های بتا تالاسمی مختلفی که در جمعیت ایران تشخیص داده شده است، IVSII-1 (G/A) شایع‌ترین جهش در بیشتر نواحی ایران است. هدف مطالعه حاضر، تعیین میزان اختصاصیت و حساسیت روش HRM (High-resolution melting) در تشخیص افراد حامل جهش IVSII-1 (G/A) از افرادی بود که این جهش را نداشتند.

روش‌ها: در این مطالعه، ۳۰ نمونه‌ی خون افراد مبتلا به تالاسمی Minor مورد بررسی قرار گرفت. ژنوتیپ هر نمونه، از قبل با استفاده از روش‌های PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)، ARMS (Amplification-refractory mutation system) یا توالی‌یابی در آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان الزهرای (س) اصفهان مشخص شده بود. استخراج DNA از خون محیطی انجام شد و نمونه‌ها با استفاده از روش HRM تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج بر اساس نمودارهای طبیعی‌سازی و تمایز، تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه، روش HRM توانست افراد حامل جهش IVSII-1 را با اختصایت و حساسیت ۱۰۰ درصد شناسایی کند.

نتیجه‌گیری: روش HRM اختصاصیت و حساسیت بالایی دارد. از این رو، روش مناسبی برای تشخیص جهش‌های شایع انواع بیماری‌های ژنتیکی می‌باشد.

واژگان کلیدی: بتا تالاسمی Minor، IVSII-1 (G/A)، High-resolution melting (HRM)، نمودار طبیعی‌سازی، نمودار تمایز

ارجاع: آخوندی فاطمه، عمادی بایگی مجتبی، صالحی منصور، نیک‌پور پروانه. **شناسایی جهش IVSII-I ژن بتا گلوبین در ناقلین تالاسمی Minor با استفاده از روش High-Resolution Melting (HRM).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۳): ۲۱۸۶-۲۱۷۹

مقدمه

واژه‌ی تالاسمی برای اولین بار در سال ۱۹۲۵ مطرح شد (۱). تالاسمی با کاهش یا عدم تولید زنجیره‌های آلفا (α) یا بتا (β) گلوبین مشخص می‌شود،که نتیجه‌ی آن دو نوع اصلی α یا β تالاسمی است. در بتا تالاسمی، نقص تولید بتا گلوبین باعث آنمی می‌شود، زنجیره‌های آلفای اضافی که داخل تترامر گنجانده نمی شوند، ترکیبات نامحلول و ناپایداری را تولید می کنند که باعث آسیب به غشا و تخریب زودرس سلول می‌شود. این فرایند هم در پیش‌سازهای نابالغ گلبول قرمزو هم در سلول‌های بالغ صورت می‌گیرد که منجر به کم خونی می‌شود.

زنجیره‌ی بتا گلوبین، توسط ژن HBB کدگذاری می شود که به اندازه‌ی ۱۶۰۰ جفت باز روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ (11p15.4) قرار دارد (۲) و ۱۴۶ اسیدآمینه را کد می‌کند. توالی ژنومی HBB شامل سه اگزون، دو اینترون و ناحیه‌ی غیر ترجمه‌ای '۵ و '۳ (UTRs یا Untranslated regions) می‌باشد (۳).

۱- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم و پژوهشکده‌ی زیست فن‌آوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی و مرکز تحقیقات رشد و نمو کودکان و پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیر واگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر پروانه نیک‌پور
Email: pnikpour@med.mui.ac.ir

تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش برای ژن بتا گلوبین گزارش شده است. بیشتر آن‌ها موتاسیون‌های نقطه‌ای در ناحیه‌ای مهم از ژن بتا گلوبین هستند. حذف در ژن بتا گلوبین رایج نیست. دو واریانت اصلی از آلل‌های بتا تالاسمی وجود دارند. تالاسمی β^0، در این افراد هیچ بتا گلوبینی تولید نمی‌شود و تالاسمی β^+، که بتا گلوبین به مقدار کمتر از حد طبیعی تولید می‌شود (۴).

از نقطه نظر بالینی، تالاسمی به انواع Major ،Minor و بینابینی طبقه‌بندی می‌شود (۵-۴). بتا تالاسمی در کشورهای اطراف دریای مدیترانه مانند یونان، ایتالیا، ترکیه و کشورهای آفریقای شمالی شایع می‌باشد. این بیماری همچنین در عربستان سعودی، پاکستان، ایران، افغانستان، هند و کشورهای آسیای شرقی مانند تایلند و اندونزی شیوع قابل توجهی دارد (۶). میزان بروز سالانه‌ی افراد علامت‌دار حدود ۱ به ۱۰۰۰۰۰ در سراسر جهان تخمین زده می‌شود. ایران در حدود ۲۰۰۰۰ بیمار هموزیگوس بتا تالاسمی و ۳۷۵۰۰۰۰ حامل دارد (۷). به خاطر وجود قومیت‌های مختلف در ایران، اساس مولکولی و شدت بالینی بتا تالاسمی در جمعیت ایران، هتروژن است. در مطالعات گذشته، جهش IVSII-1 (G/A) به عنوان شایع‌ترین آلل بتا تالاسمی در استان اصفهان (۸)، استان های شمالی (گیلان، مازندران و گلستان)، شمال غرب (آذربایجان و اردبیل) و جنوب کشور گزارش شده است (۱۰-۹).

به طور کلی، جهش IVSII-1 (G/A) شایع‌ترین جهش در ایران است (۳۲/۹ درصد). این جهش مدیترانه‌ای در ایران فراوانی بالاتری نسبت به کشورهای مدیترانه ای دارد و شیب کاهشی شرق به غرب پیشنهاد می‌کند که ممکن است ایران منشأ این جهش باشد (۱۰).

آزمون‌های تشخیص بر پایه‌ی Polymerase chain reaction (PCR) جهت تشخیص هموگلوبینوپاتی‌ها شامل اولیگونوکلئوتید اختصاصی آلل (ASO یا Allele-specific oligonucleotide) (۱۱) آزمون ARMS (Amplification-refractory mutation system) (۱۲) RFLP (Restriction fragment length polymorphism) (۱۳) Gap-PCR (۱۴) و توالی یابی (۱۵) می‌باشند. این روش‌ها جهت شناسایی جهش‌های شناخته شده در انواع هموگلوبینوپاتی کاربرد دارند. در صورتی که سایر روش‌های بر پایه‌ی PCR، جهت شناسایی جهش‌های ناشناخته بر مبنای DNA تک رشته‌ای تغییر ساختار یافته طراحی می‌شوند و شامل روش‌هایی نظیر DGGE (Denaturation gradient gel electrophoresis) (۱۶) و SSCP (Single-strand conformation polymorphism) (۱۷) می‌باشند. بدین ترتیب، ناحیه‌ی هدف شناسایی می‌شود و در ادامه، تشخیص جهش مورد نظر انجام می‌گیرد. روش نهایی جهت تشخیص جهش، روش آنالیز مستقیم تعیین توالی می‌باشد.

در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های جدید در تشخیص مولکولی توسعه یافته‌اند که در آن تزاید PCR و تعیین ژنوتیپ در یک لوله‌ی یکسان می‌توانند انجام شود. HRM (High-resolution melting) روش آنالیز جدیدی بعد از PCR محسوب می‌شود که با تکثیر ناحیه ی مورد نظر در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته شروع می شود. رنگ وقتی به DNA دو رشته ای متصل است، فلورسنس بالایی دارد و در حالت غیر باندی فلورسنس پایینی دارد. تکثیر با مرحله‌ی ذوب با قدرت تفکیک بالا دنبال می‌شود. وقتی DNA دو رشته به تک رشته تبدیل می شود، رنگ جدا شده باعث تغییر فلورسنس می گردد. نتیجه‌ی آن، منحنی ذوبی است که مشخصه‌ی آمپلیکون می‌باشد (۱۹-۱۸). هدف مطالعه‌ی حاضر، تعیین میزان اختصاصیت و حساسیت روش HRM در تشخیص افراد حامل جهش IVSII-1 (G/A) از افرادی بود که این جهش را نداشتند.

روش‌ها

در این مطالعه، نمونه‌ی خون از افراد حامل تالاسمی که دارای جهش‌های مختلف در ژن HBB بودند، از آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان الزهرای (س) اصفهان جمع‌آوری شد و DNA با استفاده از کیت دیاتوم مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (IsoGen Co, Netherland) استخراج گردید.

جهت طراحی پرایمر، ابتدا توالی مربوط به ژن HBB از پایگاه اطلاعاتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) دریافت شد و سپس پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene runner 4.09 (http://www.generunner.com) طراحی شد.

قطعه‌ی ۱۱۰ جفت بازی (bp یا Base pair) در برگیرنده‌ی جهش مورد نظر، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، شامل ۵'CTCACCTGGACAACCTCAAG۳' و ۵'ACATCAAGCGTCCCATAGAC۳' تکثیر شد. واکنش در حجم ۲۵ µl حاوی ۲/۵ µl از بافر ۱۰X، ۰/۵ µl از dNTP (Deoxynucleotide triphosphate)، ۰/۷۵ µl $MgCl_2$، از هر پرایمر ۰/۵ µl، ۰/۲۵ µl از Taq DNA polymerase و ۳ µl از DNA و ۱۷ µl آب دیونیزه انجام شد (KBC, Iran).

برنامه‌ی PCR با استفاده از دستگاه بیوئر (TC-XP-G) به صورت یک مرحله پیش دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در انتها، طویل‌سازی انتهایی در ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه اجرا شد. به منظور اطمینان از صحت انجام PCR، ۳ µl از محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. وجود باندهای ۱۱۰ bp در زیر نور UV (Ultraviolet) نشان درستی انجام کار بود. رنگ فلورسنت Green viewer (Afratoos, Iran) جهت

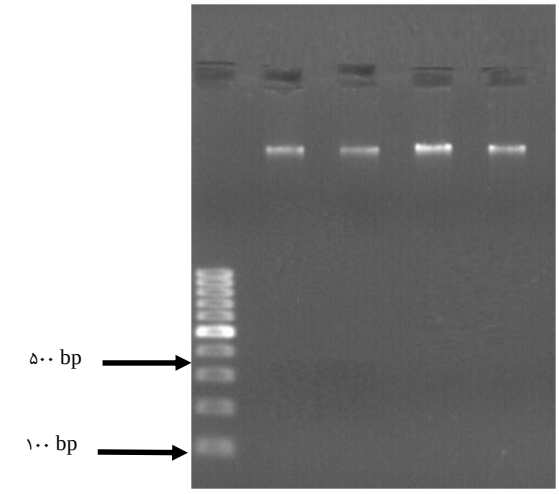
مشاهده‌ی باندها مورد استفاده قرار گرفت. بعد از بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR، با استفاده از دستگاه Rotor Gene Q، واکنش HRM در حجم ۱۰ µl حاوی ۵ µl مستر HRM، ۳/۹ آب RNase-free با استفاده از کیت it Type (Qiagen Co,Germany)، ۰/۳ µl از هر پرایمر و ۰/۵ µl از DNA انجام شد.

برنامه‌ی حرارتی دستگاه Rotor Gene Q به شرح زیر بود: مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵ °C به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۱۰ ثانیه که با یک مرحله گرم کردن رشته‌های DNA تا ۹۰ °C و خنک کردن رشته‌ها تا ۴۰ °C ادامه یافت. سپس HRM به اندازه‌ی یک چرخه انجام شد که شامل افزایش دما از ۶۵ °C تا ۹۵ °C بود. دمایی که در آن نصف رشته‌های DNA به صورت تک رشته‌ای است، به عنوان دمای ذوب در نظر گرفته شد. سپس چند نمونه برای اطمینان از صحت قطعات تکثیری روی ژل ۱ درصد بارگذاری شدند.

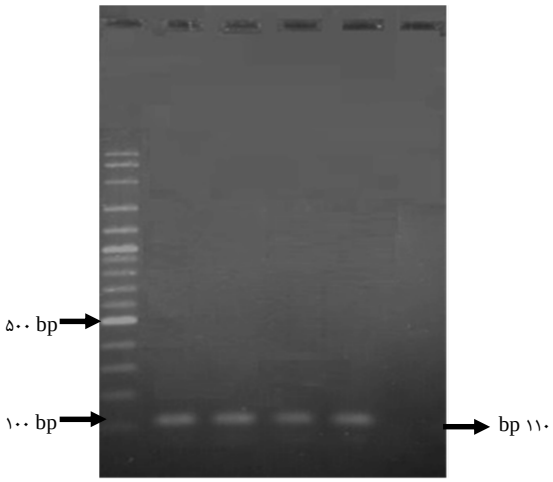
یافته‌ها

در این مطالعه، در مجموع ۳۰ نمونه از خون محیطی افراد ناقل تالاسمی Minor مورد استفاده قرار گرفت. از این تعداد، ۲۰ نمونه شایع‌ترین جهش تالاسمی در اصفهان (IVSII-1(G/A و ۱۰ نمونه جهش های دیگر از جمله IVSI-5، Fr8/9 و ۸۸- را داشتند که در این جا به عنوان نمونه‌ی شاهد محسوب شدند. همه‌ی نمونه‌ها با استفاده از روش HRM تعیین ژنوتیپ شدند.

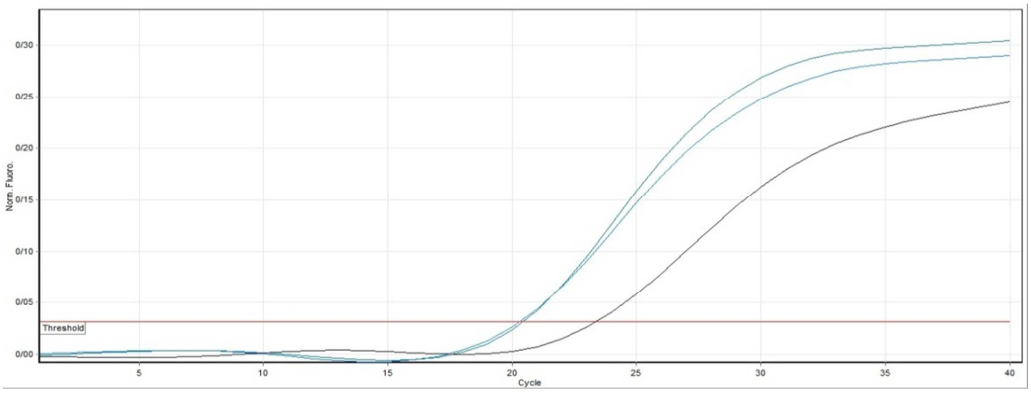
در این پژوهش، بعد از استخراج نمونه‌های DNA و مشاهده‌ی باند بدون اسمیر (شکل ۱)، مقدار ng ۵۰ از آن‌ها برای بهینه‌سازی واکنش PCR معمولی (شکل ۲) و انجام HRM استفاده شد که ابتدا ۴۰ چرخه‌ی تکثیر برای افزایش کپی‌های DNA انجام شد (شکل ۳).



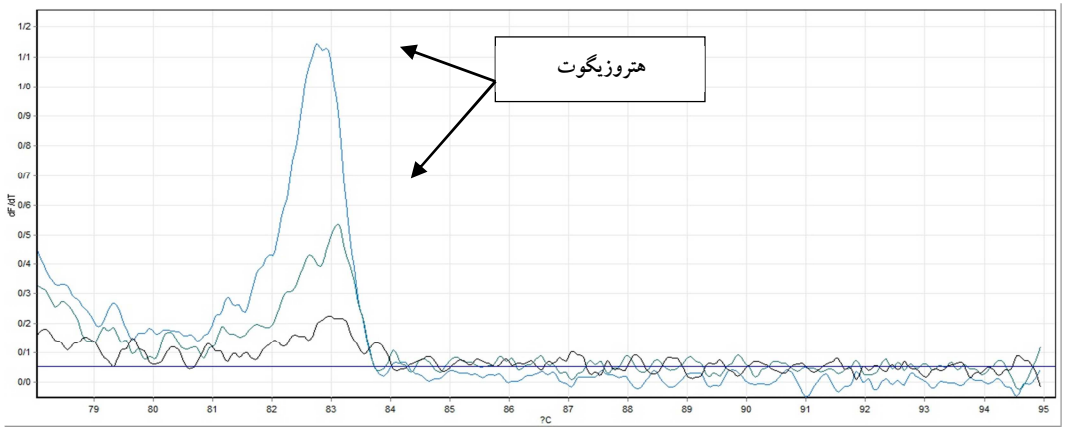
شکل ۱. نتایج الکتروفورز DNAی استخراج شده از خون تام افراد مورد مطالعه بر روی ژل آگارز. باندهای DNA بیانگر کیفیت مناسب آن برای انجام مراحل بعدی می‌باشد.



شکل ۲. تکثیر قطعه‌ی ۱۱۰جفت بازی. همان‌طور که در تصویر مشخص است، در دمای ۶۰ °C تکثیر برای نمونه‌های مختلف با موفقیت انجام شد.



شکل ۳. منحنی تکثیر قطعه در دستگاه Real-time. افزایش رنگ متصل به DNAی دو رشته‌ای نشان دهنده‌ی تکثیر DNA به مقدار زیاد می‌باشد. خط Threshold نشان دهنده‌ی چرخه‌ای از PCR (Polymerase chain reaction) است که این افزایش کپی‌های DNA قابل شناسایی است.



شکل ۴. منحنی ذوب خام داده‌ها. با افزایش دما و تک رشته‌ای شدن DNA، رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای آزاد می‌شود و در جایی که دمای ذوب نام دارد، قله ایجاد می‌گردد که نشان دهنده‌ی تک رشته‌ای شدن نیمی از DNAهای دو رشته‌ای است. هتروزیگوت‌ها دارای دو قله می‌باشند که نشان دهنده‌ی دو هومودوپلکس و دو هترودوپلکس می‌باشد.

تفاوت چرخه‌ی آستانه برای نمونه‌ها نباید از ۳ تا بیشتر شود که در این جا چرخه‌ی آستانه‌ی نمونه‌ها چرخه‌ی ۲۰ بود. سپس برای این که فرصت کافی برای تشکیل هترودوپلکس‌ها فراهم شود، ابتدا دما تا ۹۰ ^{o}C افزایش داده شد و بعد تا ۴۰ ^{o}C کاهش یافت. در مرحله‌ی آخر، دما از ۶۵ ^{o}C تا ۹۵ ^{o}C به اندازه‌ی یک چرخه به آرامی افزایش داده شد که رنگ از DNA دو رشته ای با افزایش دما جدا شد. نمونه‌های هتروزیگوت به علت داشتن دو هومودوپلکس و دو هترودوپلکس به حالت دو قله‌ای می‌باشند (شکل ۴).

سپس، با استفاده از نرم‌افزار Rotor Gene Q نسخه‌ی ۲/۰/۲ نمودار طبیعی‌سازی و تمایز ترسیم شد. با توجه به نمودار طبیعی‌سازی (شکل ۵) حالت هتروزیگوت برای جهش IVSII-1 شکل منحنی ذوب را نسبت به حالتی که این جهش را ندارد، تغییر می‌دهد.

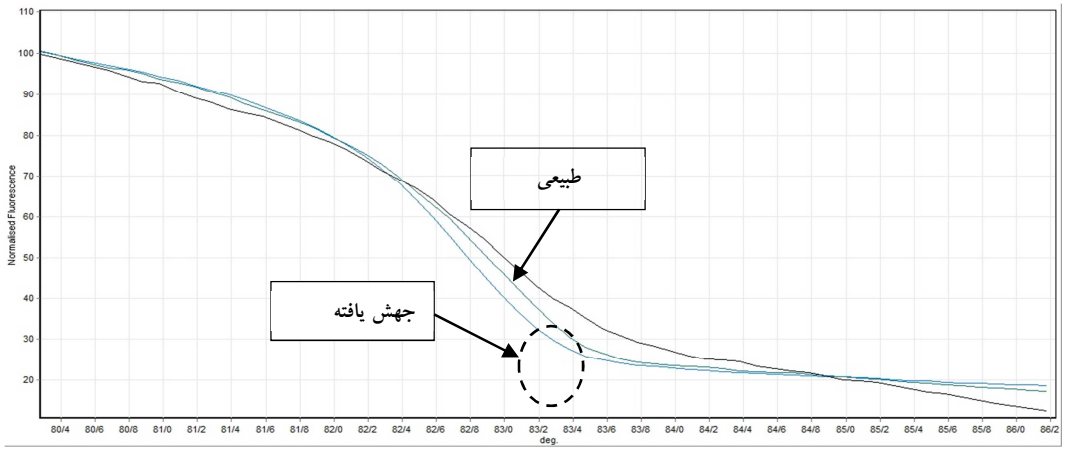
وجود توالی جهش یافته حتی در مقدار کم، نمودار تمایزی ایجاد کرد که به آسانی از نمودار نمونه‌ی سالم قابل تشخیص بود (شکل ۶).

در مجموع، نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش HRM نشان داد که این روش با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد می‌تواند افراد حامل جهش IVSII-1(G/A) را از سایر افراد افتراق دهد.

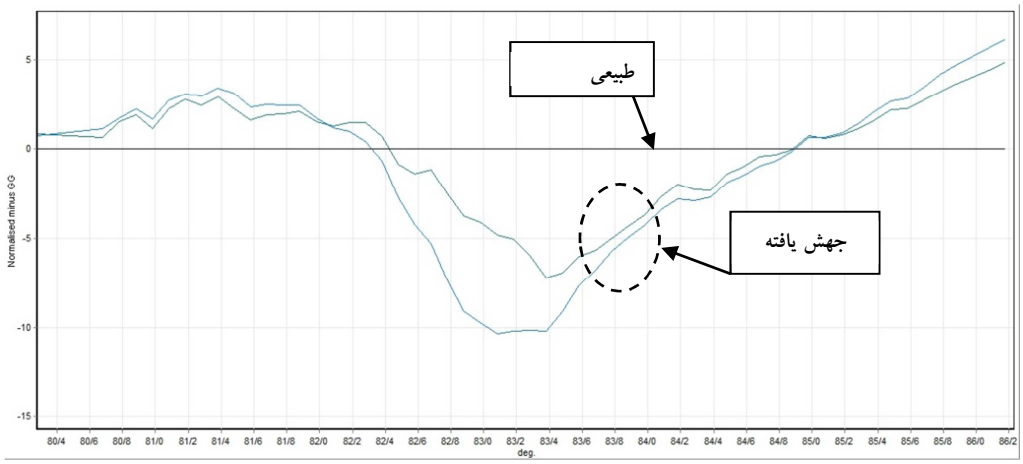
بحث

بیماری بتا تالاسمی در بیش از۶۰ کشور که در مجموع به عنوان کمربند تالاسمی خوانده می‌شوند، گزارش شده است. وجود جهش بتا تالاسمیک مدیترانه‌ای IVSII-1 با فرکانس بالا در بیشتر قسمت‌های کشور به منشأ مستقل آن مربوط می‌شود (۲۰).

این جهش مدیترانه ای، در ایران نسبت به ترکیه فراوانی بیشتری دارد و می تواند بیانگر این مطلب باشد که منشأ این جهش، ایران است (۲۲-۲۱).



شکل ۵. نمودار طبیعی‌سازی شده‌ی نمونه‌های طبیعی و جهش‌دار. همان‌طور که در شکل مشخص است، شکل نمودار نمونه‌های جهش یافته‌ی هتروزیگوت GA نسبت به نمونه‌ی طبیعی متفاوت است.



شکل ۶. تمایز نمونه‌های جهش یافته از حالت طبیعی با استفاده از نمودار تمایز. همان‌طور که در شکل مشخص است، این نمودار باعث تفکیک نمونه‌های هتروزیگوت GA از نمونه‌ی طبیعی GG شد.

اگر چه تعیین توالی مستقیم به عنوان روش استاندارد برای تعیین جهش های شناخته شده و نشده می باشد، اما به نسبت گران قیمت، سخت و زمان‌بر می‌باشد. روش‌های بر پایه‌ی PCR شامل پلی‌مورفیسم کنفورماسیون تک رشته‌ای (SSCP) (۲۳)، High-performance liquid chromatography (۲۴)، Temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE) (۲۸، ۲۵)، پلی‌مورفیسم قطعات طولی محدود (RFLP) (۲۶)، ARMS (۲۷) و RDB (Reverse dot blot) (۲۹) برای مشخص کردن نوع جهش بتا تالاسمی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش‌ها نیاز به جدایی محصولات PCR بر روی ژل یا ماتریکس دارند. اغلب چندین ساعت برای انجام شدن زمان لازم دارند و خطر آلودگی را به خاطر این که محصولات PCR در معرض محیط قرار می‌گیرند، افزایش می‌دهند (۳۰). درخواست برای تشخیص سریع و قابل اعتماد و شناسایی واریانت هموگلوبین و انواع تالاسمی برای تمایز نوع جهش نمونه های بالینی، درمان هدفمند یا مشاوره به سرعت در حال افزایش است. در حالی که بعضی روش‌ها برای پیدا کردن جهش های ژن بتا گلوبین در مقیاس بالا، گران قیمت و زمان بر هستند، روش HRM نشان دهنده‌ی نسل جدید تکنولوژی اسکن جهش می‌باشد و صرفه‌جویی در هزینه و زمان قابل توجهی را نسبت به روش‌های پیش‌گفته، ارایه می‌دهد (۳۱).

در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته ای اشباع شده، نمونه ها به صورت آرام گرم می شوند تا به طور کامل دناتوره شوند. در حالی که فلورسنس با گرم شدن DNA دو رشته و تک رشته ای شدن آن، آزاد می‌شود (۳۲). بعد از تکثیر شدن هتروزیگوت‌ها در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته ای، دو هموودوپلکس و دو هتروودوپلکس شکل می گیرد. وجود هترودوپلکس، شکل منحنی ذوب تکثیر یافته‌ی هتروزیگوت را در مقایسه با هموزیگوت طبیعی تغییر می دهد. تغییرات به وجود آمده، کوچک هستند؛ اما با استفاده از آنالیز منحنی ذوب با وضوح بالا تشخیص داده می‌شوند (۳۳).

در سال های اخیر، تحقیقاتی در رابطه با روش HRM انجام شده است. در یک مطالعه از Real-time gap-PCR و آنالیز HRM برای تشخیص حذف ۳/۵ کیلوبازی بتا تالاسمی استفاده شد. مشخص شد که موتاسیون به طور مستقیم از روی شکل منحنی ذوب می تواند تعیین ژنوتیپ شود (۳۴). همچنین، برای بررسی جهش ژن های *MCAD* (۳۵) و *c-kit* (۳۶) و رایج‌ترین تنوع‌های ژنتیکی MTHFR (۳۷)، از روش HRM استفاده شده است. دستگاه Real-time PCR امکان تکثیر نمونه ها، قبل از انجام HRM را در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای فراهم می‌کند.

در مطالعه‌ی حاضر، برای سنجش میزان اختصاصیت و حساسیت روش HRM در شناسایی جهش ژن بتا گلوبین، شایع ترین جهش استان اصفهان IVSII-1 (G/A) انتخاب شد. این جهش، در گذشته به روش ARMS در آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان الزهرای (س) اصفهان در این افراد مشخص شده بود. حال بر اساس این پژوهش، اختصاصیت و حساسیت روش HRM در متمایز شدن ناقلین این جهش از افراد فاقد این جهش، بررسی شد. آنالیز منحنی ذوب با وضوح بالا و ترسیم منحنی طبیعی‌سازی و منحنی تمایز ۳۰ نمونه‌ی افراد ناقل تالاسمی Minor نشان دهنده‌ی این حقیقت است که روش HRM، توانایی لازم در مشخص کردن جهش مورد نظر را دارا می‌باشد.

در مطالعه‌ی مرعشی و همکاران، فرکانس فنوتیپی و ژنوتیپی رایج‌ترین جهش‌های بتا تالاسمی از جمله IVSII-1 (G/A) در قزوین با استفاده از روش HRM تعیین شد. در آن مطالعه،

اختصاصیت و حساسیت روش HRM در مشخص کردن جهش IVSII-1 (G/A) ۱۰۰ درصد بود که این یافته با نتیجه‌ی به دست آمده در پژوهش حاضر همسو است (۳۸).

محدودیت اصلی روش HRM این است که ماهیت دقیق جهش به آسانی قابل شناسایی نمی‌باشد؛ بنا بر این لازم است که همراه روش توالی یابی مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود، روش HRM روشی حساس، ارزان قیمت و با دقت بالا می باشد. همچنین، آنالیز HRM از مزایایی شامل کاهش نیروی انسانی، صرفه جویی در زمان و کاهش خطر آلودگی نسبت به سایر روش‌ها برخوردار می‌باشد. به علاوه، آنالیز HRM یکی از روش‌های مقرون به صرفه در آزمایشگاه تشخیص طبی با حجم نمونه‌ی متوسط تا بالا می‌باشد (۳۹).

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد فاطمه آخوندی بوده و با حمایت مالی دانشگاه شهرکرد به انجام رسیده است. از کلیه‌ی پرسنل آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان الزهرای (س) اصفهان که در تهیه‌ی نمونه‌ها و جمع‌آوری اطلاعات بیماران همکاری صمیمانه‌ای داشتند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Vichinsky EP, MacKlin EA, Waye JS, Lorey F, Olivieri NF. Changes in the epidemiology of thalassemia in North America: a new minority disease. Pediatrics 2005; 116(6): e818-e825.
2. Lahiry P, Al-Attar SA, Hegele RA. Understanding beta-thalassemia with focus on the Indian subcontinent and the Middle East. Open Hematol J 2008; 2(1): 5-13.
3. Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. N Engl J Med 2005; 353(11): 1135-46.
4. Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 2007; 67(1): 11-26.
5. Urbinati F, Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias. Expert Rev Mol Med 2006; 8(10): 1-26.
6. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. Baillieres Clin Haematol 1998; 11(1): 1-51.
7. Karimi M, Jamalian N, Yarmohammadi H, Askarnejad A, Afrasiabi A, Hashemi A. Premarital screening for beta-thalassaemia in Southern Iran: options for improving the programme. J Med Screen 2007; 14(2): 62-6.
8. Salehi R, Fisher CA, Bignell PA, Eslami G, Old JM. Identification of three novel mutations [-41 (A>C), codon 24 (-G), and IVS-I-109 (-T)], in a study of beta-thalassemia alleles in the Isfahan region of Iran. Hemoglobin 2010; 34(1): 115-20.
9. Derakhshandeh-Peykar P, Akhavan-Niaki H, Tamaddoni A, Ghawidel-Parsa S, Naieni KH, Rahmani M, et al. Distribution of beta-thalassemia mutations in the northern provinces of Iran. Hemoglobin 2007; 31(3): 351-6.
10. Hosseinpour Feizi MA, Hosseinpour Feizi AA, Pouladi N, Haghi M, Azarfam P. Molecular spectrum of beta-thalassemia mutations in Northwestern Iran. Hemoglobin 2008; 32(3): 255-61.
11. Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86(16): 6230-4.
12. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res 1989; 17(7): 2503-16.
13. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230(4732): 1350-4.
14. Phylipsen M, Amato A, Cappabianca MP, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Basak N, et al. Two new beta-thalassemia deletions compromising prenatal diagnosis in an Italian and a Turkish couple seeking prevention. Haematologica 2009; 94(9): 1289-92.
15. Chern SR, Chen CP. Molecular prenatal diagnosis of thalassemia in Taiwan. Int J Gynaecol Obstet 2000; 69(2): 103-6.
16. Vrettou C, Palmer G, Kanavakis E, Tzetis M, Antoniadi T, Mastrominas M, et al. A widely applicable strategy for single cell genotyping of beta-thalassaemia mutations using DGGE analysis: application to preimplantation genetic diagnosis. Prenat Diagn 1999; 19(13): 1209-16.
17. Takahashi-Fujii A, Ishino Y, Kato I, Fukumaki Y. Rapid and practical detection of beta-globin mutations causing beta-thalassemia by fluorescence-based PCR-single-stranded conformation polymorphism analysis. Mol Cell Probes 1994; 8(5): 385-93.
18. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. Clin Chem 2004; 50(7): 1156-64.
19. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. Clin Chem 2003; 49(6 Pt 1): 853-60.
20. Rahimi Z. Genetic epidemiology, hematological and clinical features of hemoglobinopathies in Iran. Biomed Res Int 2013; 2013: 803487.
21. Patrinos GP, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DH, Anagnou NP, et al. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. Nucleic Acids Res 2004; 32(Database issue): D537-D541.
22. Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S,

Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, et al. The beta-thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin 2001; 25(3): 285-96.
23. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86(8): 2766-70.
24. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. Hum Mutat 2001; 17(6): 439-74.
25. Li Q, Liu Z, Monroe H, Culiat CT. Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. Electrophoresis 2002; 23(10): 1499-511.
26. Sanguansermsri P, Shimbhu D, Wongvilairat R,Sanguansermsri T. Associations of common beta-thalassemia mutations with beta-globin gene frameworks in Northern Thailand. ASEAN Journal on Science and Technology for Development, 2004; 21(1): 53-6.
27. Tan JA, Tay JS, Lin LI, Kham SK, Chia JN, Chin TM, et al. The amplification refractory mutation system (ARMS): a rapid and direct prenatal diagnostic technique for beta-thalassaemia in Singapore. Prenat Diagn 1994; 14(11): 1077-82.
28. Shaji RV, Edison ES, Poonkuzhali B, Srivastava A, Chandy M. Rapid detection of beta-globin gene mutations and polymorphisms by temporal temperature gradient gel electrophoresis. Clin Chem 2003; 49(5): 777-81.
29. Cai SP, Wall J, Kan YW, Chehab FF. Reverse dot blot probes for the screening of beta-thalassemia mutations in Asians and American blacks. Hum Mutat 1994; 3(1): 59-63.
30. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E. Rapid screening of multiple beta-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. Clin Chem 2003; 49(5): 769-76.
31. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics 2007; 8(6): 597-608.
32. Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. Nat Protoc 2007; 2(1): 59-66.
33. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. Clin Chem 2004; 50(10): 1748-54.
34. Prathomtanapong P, Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguansermsri T. Detection and identification of beta-thalassemia 3.5 kb deletion by SYBR Green1 and high resolution melting analysis. Eur J Haematol 2009; 82(2): 159-60.
35. McKinney JT, Longo N, Hahn SH, Matern D, Rinaldo P, Strauss AW, et al. Rapid, comprehensive screening of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. Mol Genet Metab 2004; 82(2): 112-20.
36. Willmore C, Holden JA, Zhou L, Tripp S, Wittwer CT, Layfield LJ. Detection of c-kit-activating mutations in gastrointestinal stromal tumors by high-resolution amplicon melting analysis. Am J Clin Pathol 2004; 122(2): 206-16.
37. Norambuena PA, Copeland JA, Krenkova P, Stambergova A, Macek M, Jr. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. Clin Biochem 2009; 42(12): 1308-16.
38. Marashi SJ, Eshkoor SA, Mirinargesi MS, Reza M. Detection of eight common β-globin gene mutation in thalassemia major patients using real time polymerase chain reaction (PCR)-high resolution melting and EvaGreen™ dye. Afr J Biotechnol 2012; 11(2): 1486-96.
39. Shih HC, Er TK, Chang TJ, Chang YS, Liu TC, Chang JG. Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis. Clin Biochem 2009; 42(16-17): 1667-76.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 33, No. 363, 3rd Week, February 2016

Received: 15.10.2015

Accepted: 20.01.2016

Detection of IVSII-1 Mutation of Beta Globin Gene in Carriers of Thalassemia Minor Using High-Resolution Melting Analysis

Fatemeh Akhondi MSc[1], Mojtaba Emadi-Baygi PhD[2], Mansour Salehi PhD[3], Parvaneh Nikpour PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Beta-thalassemia is one of the most common autosomal recessive disorders in the world population caused by more than 200 different mutations in the beta-globin chain. It is clinically classified as minor, intermediate and major. Beta-thalassemia is the most common monogenic disease in the Mediterranean countries, Middle East, Indian Subcontinent, and Southeast Asia and one of the widespread hereditary disorders in Iran. Among different β-thalassemia mutations identified among Iranian populations, IVSII-1 (G/A) is the most frequent mutation in different regions of Iran. This study aimed to determine the specificity and sensitivity of high-resolution melting (HRM) method in the diagnosis of individuals carrying IVSII-1 (G/A) mutations from patients who do not have this mutation.

Methods: In this study, blood samples collected from 30 individuals carrying minor thalassemia were assessed. The genotype of each sample was previously determined via the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) or amplification-refractory mutation system (ARMS) or sequencing method in the genetic laboratory of Al-Zahra hospital, Isfahan, Iran. DNA extraction from peripheral blood was performed and high-resolution melting method was used for genotype samples. The results were analyzed according to the normalized and difference plots.

Findings: High-resolution melting analysis identified individuals carrying IVSII-1 (G/A) mutation with a sensitivity and specificity of 100%.

Conclusion: In summary, high-resolution melting method showed high sensitivity and specificity. Therefore, it is an appealing technique for identification of common mutations in genetic diseases.

Keywords: Beta thalassemia minor; IVSII-1(G/A), High-resolution melting (HRM); Normalized plot; Difference plot

Citation: Akhondi F, Emadi-Baygi M, Salehi M, Nikpour P. **Detection of IVSII-1 Mutation of Beta Globin Gene in Carriers of Thalassemia Minor Using High-Resolution Melting Analysis.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(363): 2179-86

1- Department of Genetics, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics School of Basic Sciences AND Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Applied Physiology Research Center AND Child Growth and Development Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Parvaneh Nikpour PhD, Email: pnikpour@med.mui.ac.ir